

## Flowcytometrisch onderzoek naar de effecten van metabole en oxidatieve veranderingen op de mitochondriële membraanpotentiaal in lymfocyten

J. HESSELS<sup>1</sup>, R. WENSINK<sup>2</sup>, M. van WIJNEN<sup>1</sup> en H.H.M. EIDHOF<sup>2</sup>

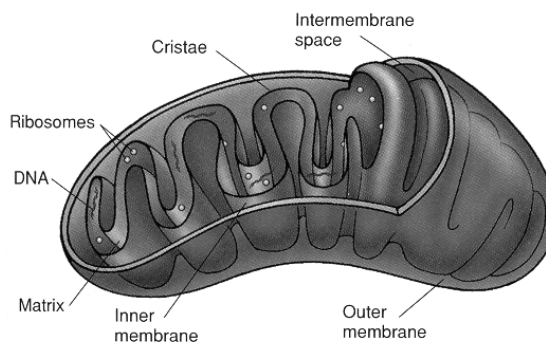
### Inleiding

Met behulp van de geoptimaliseerde methode voor bepaling van de mitochondriële membraanpotentiaal (MMP) door middel van JC-1 zijn we in staat kleine veranderingen in de MMP van lymfocyten flowcytometrisch te meten (1, 2). Veranderingen in MMP kunnen enerzijds worden veroorzaakt door (aangeboren) verstoringen in de metabole processen nodig voor de vorming van protonen en elektronen (glycolyse, citroenzuurcyclus, vetzuroxidatie) of het transport van deze deeltjes over de elektronentransportketen via complex I t/m V en anderzijds door oxidatieve stress ten gevolge van een overmaat aan 'radical oxygen species' (ROS) of verstoring van de intracellulaire redoxstatus. Figuur 1 laat een schematische opbouw zien van een mitochondrion. Om na te gaan in hoeverre natuurlijke substraten en intermediaire metabolieten invloed hebben op de MMP zijn de lymfocyten geïncubeerd met verschillende natuurlijke substraten en remmers van de glycolyse en de ademhalingsketen. Om na te gaan in hoeverre de oxidatieve status van de mitochondriën invloed heeft op de MMP is de vorming van 'radical oxygen species' (ROS) indirect bewerkstelligd door behandeling met forbol-12-myristaat-13-acetaat (PMA). Directe verandering van de redoxstatus is bewerkstelligd door toevoeging van zwavelhoudende aminozuren. Het antioxidatieve effect van de gebruikte substraten en intermediaire metabolieten is eveneens bestudeerd.

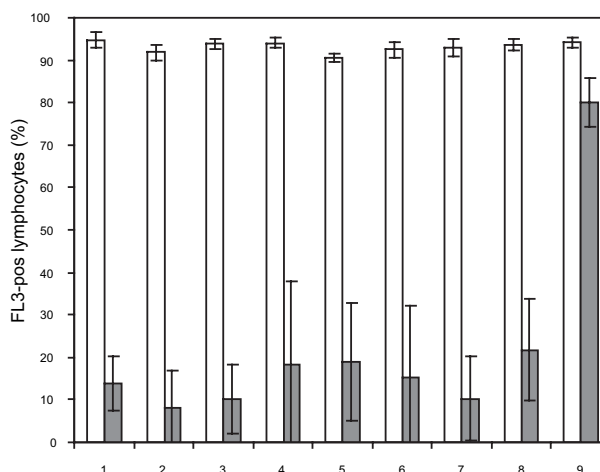
### Materiaal en methoden

In alle experimenten is gebruik gemaakt van de optimale meetcondities zoals eerder beschreven (1): aantal leuco's  $3 \times 10^9$  /l; lysis van rode bloedcellen met ammoniumchloride/bicarbonaatoplossing; incubatie in 'minimal essential medium' (MEM) of in 'Leibowitz', gedurende 2 uur pH 7,3, eventueel toegevoegd met substraten, metabolieten, remmers, oxidantia en anti-oxidantia; incubatie gedurende 15 minuten bij 37 °C met JC-1-reagens: 7 µM JC-1 en 0,2 g/l cyclosporine A in fysiologisch zout; afkoelen op ijs en binnen 1 uur meten op flowcytometer bij emissiefluorescentie van 525 nm (FL1) en 620 nm (FL3). Het percentage lymfocyten met rode fluorescentie is een maat voor de MMP van de lymfocytenpopulatie. Preïncubatie-

studies zijn uitgevoerd zonder substraat (PBS/BSA), 5 mM glucose, 5 mM galactose, 5 mM fructose, 150 µM octaanzuur, 150 µM capronzuur, 2,5 mM alanine of 5 mM pyruvaat. Daarnaast zijn lymfocyten geïncubeerd met een specifieke remmer van de glycolyse (10 mM deoxyglucose) en glycolyse/citroenzuurcyclus (10 mM dichlooracetaat). De verandering van de intracellulaire redoxstatus is onderzocht door incubatie met 15 nM PMA of toevoeging van 0,1 mM homocysteïne, homocystine, cysteïne, cystine en gereduceerd glutathion.

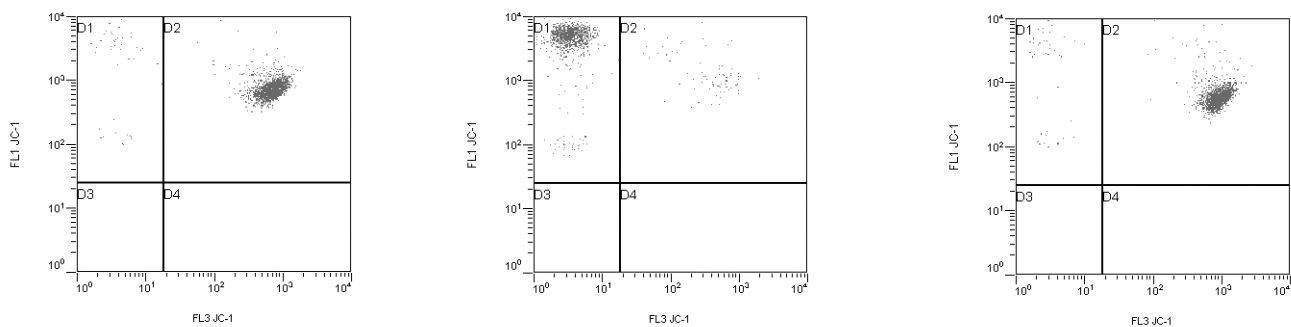


**Figuur 1.** Opbouw van een mitochondrion met karakteristieke dubbelmembraan met een membraanpotentiaal van -190 mV over de binnenmembraan.



**Figuur 2.** Invloed van substraten op zonder PMA (niet gearceerde balken) en met 15 nM PMA (gearceerde balken) gestimuleerde lymfocyten: 1. PBS/BSA; 2. PBS/BSA + essentiële vitamines en aminozuren (MEM-medium); 3. MEM-medium + 5 mM glucose/insuline; 4. MEM-medium + 5 mM galactose; 5. MEM-medium + 5 mM fructose; 6. MEM-medium + 150 µM octaanzuur; 7. MEM-medium + 150 µM capronzuur; 8. MEM-medium + 2,5 mM alanine; 9. MEM-medium + 2,5 mM pyruvaat.

Klinisch Chemisch Laboratorium<sup>1</sup>, Deventer Ziekenhuis, Deventer; Klinisch Laboratorium<sup>2</sup>, Ziekenhuisgroep Twente, locatie Twenteborg, Almelo



**Figuur 3.** 'Dot plot' van geselecteerde lymfocyten ('gate' in FSC/SCC-plot) behandeld met JC-1 en 2 uur incubatie met MEM-medium. Cellen gemeten bij 525 nm (groen; FL1) en 620 nm (rood; FL3). A: geen cysteïne en geen pyruvaat; B: 0,1 mM cysteïne, geen pyruvaat; C: 0,1 mM cysteïne en 5 mM pyruvaat.

## Resultaten

Gedurende de 2 uur incubatie bij 37 °C is de gemeten MMP ook zonder toegevoegd substraat nog intact. Ook remmers van glycolyse hebben hierop geen effect (figuur 2). Blijkbaar zijn er voldoende (intermediaire) metabolieten in de cel aanwezig om deze gedurende 2 uur van energie te voorzien. Na 3 uur treedt er daling op van de MMP (resultaten niet getoond). PMA veroorzaakt oxidatieve stress in de mitochondriën voorafgaand aan het bekende effect van celproliferatie en differentiatie. Dit weerspiegelt zich in een concentratieafhankelijke afname in de MMP na incubatie met PMA van normaal ongeveer 95 % naar 10 – 20 % FL3-positieve lymfocyten: in figuur 2 is alleen de afname bij 15 nM PMA weergegeven. Van alle onderzochte substraten blijkt alleen pyruvaat in staat de MMP te behouden na PMA-behandeling. Van de onderzochte zwavelhoudende aminozuren blijken cysteïne en glutathion een concentratieafhankelijke afname van de MMP te veroorzaken; in figuur 3 is alleen de afname bij 0,1 mM weergegeven. Ook hier blijkt dat alleen pyruvaat in staat is de membraanpotentiaal te beschermen voor daling van de MMP ten gevolge van veranderde redoxpotentiaal (figuur 3). Hieruit blijkt dat geringe veranderingen in redoxstatus een groot effect op de MMP hebben en

dat pyruvaat een zeer effectieve antioxidant blijkt te zijn.

## Conclusie

Met de beschreven flowcytometrische methode kan met behulp van JC-1 snel en uiterst gevoelig veranderingen in de MMP van lymfocyten worden gemeten. Pyruvaat is een effectieve antioxidant, wat in het verleden eerder is beschreven in onder andere thymocyten (3), maar waar tot nu toe te weinig aandacht voor is. Klinische studies zijn nodig om de antioxidatieve werking van pyruvaat ook *in vivo* te bestuderen.

## Literatuur

1. Hessels J, Wijnen M, van Wensink R, Eidhof HHM. Nieuwe methode voor het bepalen van de mitochondriële membraanpotentiaal in lymfocyten met flowcytometrie. *Ned Tijdschrift Klin Chem Labgeneesk* 2004; 29: 59.
2. Cossarizza A, Baccarani-Contri M, Kalashnikova G, Franceschi C. A new method for the cytofluorimetric analysis of mitochondrial membrane potential using the J-aggregate forming lipophilic cation JC-1. *Biochem Biophys Res Comm* 1993; 197: 40-45.
3. Brand KA, Hermfisse U. Aerobic glycolysis by proliferating cells: a protective strategy against reactive oxygen species. *FASEB J* 1997; 11: 388-395.